



DOI:10.22144/ctujos.2023.233

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG CHUYỂN HÓA GLUCOSE THÀNH ACID GLUCONIC

Huỳnh Ngọc Trúc Phương<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Triều<sup>2</sup>, Lý Kim Hân<sup>1</sup>, Võ Phát Tài<sup>3</sup> và Nguyễn Thị Phi Oanh<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Sinh viên ngành Sinh học Khóa 45, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Học viên ngành Sinh thái học Khóa 28, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): ntpoanh@ctu.edu.vn

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 18/08/2023

Sửa bài (Revised): 20/09/2023

Duyệt đăng (Accepted): 09/10/2023

**Title:** Isolation of bacteria capable of converting glucose to gluconic acid

**Author(s):** Huỳnh Ngọc Trúc Phương, Nguyễn Thanh Triều, Lý Kim Hân, Võ Phát Tài and Nguyễn Thị Phi Oanh\*

**Affiliation(s):** Can Tho University

### TÓM TẮT

Acid gluconic được ứng dụng trong xây dựng, công nghệ thực phẩm, dược phẩm, v.v. Một số loài vi sinh vật cũng được chứng minh có khả năng sử dụng glucose để tổng hợp acid gluconic. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng chuyển hóa glucose thành acid gluconic. Hai mươi lăm dòng vi khuẩn có khả năng sử dụng glucose đã được phân lập từ các loại vỏ trái cây, trong đó, ba dòng GAB3, GBN6 và GSF5 chuyển hóa glucose (100 g/L) thành acid gluconic hiệu quả nhất trong môi trường khoáng tối thiểu có pH từ 5 đến 8 sau 5 ngày nuôi cấy. Dòng vi khuẩn GSF5 tổng hợp acid gluconic cao nhất, đạt 29,19 g/L khi được nuôi cấy trong môi trường có pH = 6. Kết quả phân tích và so sánh trình tự gen 16S-rRNA cho thấy dòng vi khuẩn GSF5 thuộc chi *Staphylococcus* và được định danh là *Staphylococcus* sp. GSF5.

**Từ khóa:** Acid gluconic, glucose, phân lập, *Staphylococcus* sp. GSF5

### ABSTRACT

Gluconic acid is applied in construction, food technology, pharmaceutical products, etc. Many studies indicated that microorganisms were potential candidates for the production of gluconic acid from glucose. This study aimed at the isolation of indigenous bacteria that can transform glucose to gluconic acid. Twenty-five bacterial strains capable of utilizing glucose were isolated from different fruit peels. Three strains GAB3, GBN6, and GSF5 were able to effectively convert glucose (100g/L) to gluconic acid in a minimal medium with pH ranging from 5 to 8 after 5 days of inoculation. Strain GSF5 producing 29.19 g/L showed the highest gluconic acid synthesis ability in the medium at pH6 and was identified as *Staphylococcus* sp. GSF5 based on 16S-rRNA gene sequence analysis and alignment.

**Keywords:** Gluconic acid, glucose, isolation, *Staphylococcus* sp. GSF5

## 1. GIỚI THIỆU

Acid gluconic được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp, thực phẩm, dược phẩm, dệt, luyện kim, thuốc da, vật liệu xây dựng và nhiều ngành công nghiệp khác (Cannete et al., 2016). Trong xây dựng, acid gluconic được sử dụng như một chất phụ gia để tăng khả năng chống chịu của xi măng và ổn định trong điều kiện khí hậu khắc nghiệt. Trong công nghệ thực phẩm, acid gluconic được sử dụng làm chất điều vị, phụ gia trong sản xuất bánh nướng, sữa đậu nành, sữa chua, phô mai và bánh mì (Ramachandran et al., 2006).

Trên thế giới, nghiên cứu sản xuất acid gluconic ngày càng được quan tâm. Trong vài thập kỷ qua, sản xuất acid gluconic và các dẫn xuất của chúng được thực hiện bằng phương pháp lên men nhờ vi sinh vật sử dụng các nguồn carbon khác nhau (Cannete et al., 2016). Nhiều vi sinh vật đã được chứng minh có khả năng chuyển hóa glucose thành acid gluconic như nấm *Aspergillus niger* (Lu et al., 2015), *Penicillium* (Herrick & May, 1928) hoặc vi khuẩn *Pseudomonas* (Alonso et al., 2015), *Gluconobacter* (Peters et al., 2013) và *Acetobacter* (Stephan et al., 1991). Tuy nhiên cho đến nay, ở Việt Nam nói chung và đồng bằng sông Cửu Long nói riêng chưa có nghiên cứu nào về vi khuẩn có khả năng tổng hợp acid gluconic đã được công bố. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng chuyển hóa glucose thành acid gluconic, làm tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn vào việc tổng hợp acid gluconic bằng phương pháp sinh học.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thu mẫu

Mẫu trái cây dùng để phân lập vi khuẩn bao gồm chuối xiêm (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*), cóc (*Spondias dulcis*), khế ngọt (*Averrhoa carambola* L.) và khóm (*Ananas comosus* (L.)) được thu tại vườn nhà thuộc xã Thiện Mỹ, huyện Trà Ôn, tỉnh Vĩnh Long. Đối với mỗi loại trái cây, thu ngẫu nhiên 3 trái chín (trái còn trên cây và còn nguyên vỏ) bằng bao tay sạch và bảo quản trong túi nylon. Mẫu sau khi thu được trữ trong nước đá khi chuyển về phòng thí nghiệm.

### 2.2. Phân lập vi khuẩn có khả năng sử dụng glucose

Mỗi loại trái cây gồm 3 trái được gọt vỏ, cắt vò thành hình vuông (khoảng 1cm x 1cm) và trộn đều trong cốc thủy tinh sạch. Từng loại vỏ trái cây (5 g mẫu) được cho vào bình tam giác 100 mL chứa 45

mL môi trường khoáng tối thiểu (MM) lỏng có bổ sung 100 g/L glucose đã được khử trùng. Mẫu sau khi chuyển vào môi trường lỏng được lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (30 - 32°C). Sau 3 ngày, mẫu được để yên 30 phút và dung dịch huyền phù vi khuẩn được pha loãng đến  $10^{-5}$ . Sau đó, dung dịch huyền phù của từng độ pha loãng (100  $\mu$ L) được hút và trải lên môi trường MM đặc có bổ sung 100 g/L glucose, mẫu được ủ ở 32°C. Sau 7 ngày, những khuẩn lạc rời rạc, khác nhau về hình thái được chọn để tiếp tục phân lập thuần bằng phương pháp cấy rìa trên môi trường MM đặc có bổ sung 100 g/L glucose (Anastassiadis et al., 2003; Voon et al., 2016, có hiệu chỉnh). Sau đó, các khuẩn lạc tiếp tục được cấy rìa để làm ròng trên môi trường Tryptone soya agar (TSA, 30 g/L Tryptone soya broth và 15 g/L agar). Độ thuần của vi khuẩn phân lập được xác định dựa vào hình thái khuẩn lạc như màu sắc, độ nổi, bia, bề mặt và hình dạng tế bào dưới kính hiển vi. Những dòng vi khuẩn thuần được mô tả hình thái khuẩn lạc sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường TSA và xác định Gram (Ảnh, 2006). Thành phần của môi trường MM gồm 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 98,5 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5,75 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3,2 mg  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , 2,75 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,7 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,16 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1,15 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,24 mg  $\text{CuSO}_4$ , 0,24 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 mg  $\text{MoO}_3$ , 1000 mL nước cất, pH =  $7 \pm 0,2$  (Nguyen et al., 2014).

### 2.3. Khảo sát khả năng lên men của vi khuẩn

Môi trường Phenol Red Glucose Broth (PRGB: 4 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 1 g/L peptone và 5 g/L NaCl, 0,018 g/L phenol red, pH = 7,4) được sử dụng để khảo sát khả năng lên men của các dòng vi khuẩn phân lập. Chúng một khuẩn lạc của mỗi dòng vi khuẩn vào từng ống nghiệm 12 mL có chứa 10 mL môi trường PRGB, sau đó để yên ở 32°C và theo dõi khả năng lên men của vi khuẩn sau 1, 3 và 5 ngày nuôi cấy. Vi khuẩn có khả năng lên men tạo acid làm giảm pH môi trường nên môi trường chuyển màu từ đỏ sang vàng hoặc cam (Buchanan & Gibbons, 1974).

### 2.4. Khảo sát khả năng chuyển hóa glucose thành acid gluconic

Sau khi tuyển chọn được các dòng vi khuẩn có khả năng lên men sau 1 ngày nuôi cấy, khả năng chuyển hóa glucose thành acid gluconic của những dòng vi khuẩn này tiếp tục được khảo sát.

Chúng một khuẩn lạc của mỗi dòng vi khuẩn sau 72 giờ nuôi cấy trên môi trường TSA vào 4 mL môi trường TSB, mẫu được lắc 200 vòng/phút trong 12 giờ. Sau đó, điều chỉnh mật độ quang của mẫu

(OD<sub>600nm</sub>) về 0,7 (tương đương 10<sup>8</sup> CFU/mL). Chúng 100 µL huyền phù vi khuẩn (đã được điều chỉnh mật độ quang) vào ống nghiệm 12 mL có chứa 10 mL môi trường MM lỏng có bổ sung 100 g/L glucose. Các ống nghiệm được để yên ở 32°C, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Acid gluconic tạo ra trong môi trường được định lượng ở thời điểm 3, 5 và 7 ngày nuôi cấy (Sainz et al., 2016).

**2.5. Khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự chuyển hóa glucose thành acid gluconic ở vi khuẩn**

Theo Ramachandran et al. (2006), pH là yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp acid gluconic ở vi sinh vật, đặc biệt là ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme glucose oxidase tham gia chuyển hóa glucose thành acid gluconic (Yan et al., 2022). Do đó, trong nghiên cứu này, vai trò của pH đối với sự tổng hợp acid gluconic ở các dòng vi khuẩn phân lập cũng được khảo sát.

Thí nghiệm được thực hiện tương tự mô tả ở mục 2.4 với pH môi trường được hiệu chỉnh để đạt các giá trị 5, 6, 7 và 8 (Sainz et al., 2016). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Acid gluconic tạo ra trong môi trường ứng với từng giá trị pH được định lượng ở thời điểm 3, 5 và 7 ngày nuôi cấy.

**2.6. Phương pháp định lượng acid gluconic**

Acid gluconic (Macklin, độ tinh khiết 49-53 wt. % trong H<sub>2</sub>O) được định lượng theo phương pháp của Lan et al. (2020) có hiệu chỉnh.

*Thiết lập đường chuẩn:* Acid gluconic được pha thành dãy nồng độ 10, 20, 30, 40 và 50 g/L. Sau đó, dung dịch acid gluconic (40 µL) ở từng nồng độ được hút và cho vào mỗi ống nghiệm và bổ sung 360 µL nước cất, 400 µL FeSO<sub>4</sub> (0,216 mM), 5 mL PBS (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 3,63 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O và 0,24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 11,52) và 2,5 mL Indigo carmine (0,13 mM). Hỗn hợp được để yên 30 phút, sau đó đo độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp ở bước sóng 610 nm. Đường chuẩn được thiết lập dựa trên sự tương quan giữa hàm lượng acid gluconic (g/L) và độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 610 nm. Phương trình đường chuẩn có dạng  $y = 341,4x - 73,304$  (R<sup>2</sup> = 0,994), trong đó x là độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp và y là hàm lượng acid gluconic.

*Định lượng acid gluconic trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn:* Tại mỗi thời điểm khảo sát, 500 µL mẫu nuôi cấy vi khuẩn được thu và ly tâm 15.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút. Sau đó, dịch trong (40 µL) được hút để định lượng acid gluconic bằng phương pháp quang phổ và đường chuẩn đã thiết lập.

**2.7. Giải trình tự gen 16S-rRNA của vi khuẩn có khả năng chuyển hóa glucose thành acid gluconic**

Dòng vi khuẩn tiềm năng được nuôi cấy trên môi trường TSA ở 32°C trong 72 giờ. DNA của vi khuẩn được ly trích và giải trình tự (Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa, TP. Hồ Chí Minh) sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTGTTCAGACTT-3') (Frank et al., 2008) để khuếch đại đoạn gen 16S-rRNA. Thành phần của một phản ứng PCR 25 µL gồm 12,5 µL master mix, 0,5 µL cả hai loại mồi, 5 µL DNA, 7 µL nước. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR gồm 95°C (6 phút), 40 chu kỳ nhân số lượng DNA với nhiệt độ và thời gian tương ứng là 95°C (30 giây), 55°C (30 giây), 72°C (30 giây) và 72°C (5 phút). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1,5% và được giải trình tự bằng phương pháp Sanger (Blazey et al., 2006).

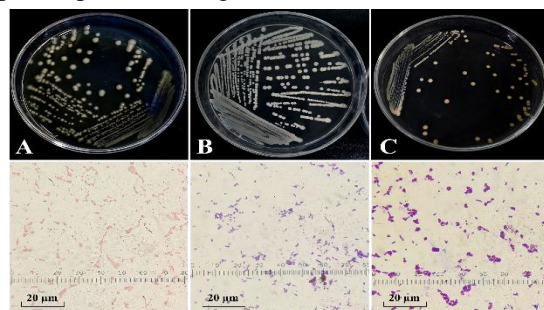
**2.8. Xử lý số liệu**

Trình tự gen 16S-rRNA của vi khuẩn tuyển chọn được so sánh với trình tự gen tương ứng trong ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BlastN. Các số liệu được tính trung bình và vẽ biểu đồ bằng Microsoft Excel 13. Phần mềm Minitab 18 được sử dụng để so sánh sự khác biệt và phân nhóm số liệu một nhân tố (one-way ANOVA) bằng kiểm định Tukey.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng sử dụng glucose**

Từ các mẫu vỏ trái cây, 25 dòng vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 100 g/L glucose đã được phân lập. Trong đó, 5 dòng vi khuẩn được phân lập từ vỏ cóc, 8 dòng vi khuẩn được phân lập từ vỏ chuối, 7 dòng vi khuẩn được phân lập từ vỏ khóm và 5 dòng vi khuẩn được phân lập từ vỏ khế ngọt.



**Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và tế bào (phóng đại 1000X) của ba dòng vi khuẩn đại diện**

Ghi chú: A: dòng GAB5, B: dòng GPA2, C: dòng GSF5

Về hình thái, các dòng vi khuẩn phần lớn có khuẩn lạc tròn hoặc không đều; màu trắng hoặc vàng; bề mặt trơn hoặc nhẵn; bìa nguyên, chia thùy hay răng cưa; độ nổi phẳng hoặc mô; kích thước khuẩn lạc từ 0,5 đến 3,5 mm sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường TSA. Tế bào của các dòng vi khuẩn có hình cầu hoặc hình que; kích thước từ 0,5 đến 4 μm, trong đó, 22 dòng vi khuẩn Gram dương và 3 dòng vi khuẩn Gram âm. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn được mô tả ở

Bảng 1. Hình dạng khuẩn lạc và tế bào của một số dòng vi khuẩn đại diện được thể hiện ở Hình 1.

Theo Sainz et al. (2016), các loài vi khuẩn thuộc chi *Gluconobacter* và *Acetobacter* được phân lập từ nho có khả năng lên men acid acetic (Navarro et al., 2013) cũng có khả năng tổng hợp acid gluconic từ glucose. Như vậy, các cơ chất như trái cây hoặc vỏ trái cây có chứa glucose là nguồn cơ chất lý tưởng có thể sử dụng để phân lập vi khuẩn chuyển hóa glucose thành acid gluconic

**Bảng 1. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của 25 dòng vi khuẩn phân lập**

TT	Dòng	Nguồn gốc	Đặc điểm khuẩn lạc					Đặc điểm tế bào			
			Hình dạng	Màu sắc	Bề mặt	Bìa	Độ nổi	Kích thước (mm)	Hình dạng	Kích thước (μm)	Gram
1	GAB1	Vỏ cốc	tròn	trắng sữa	trơn	nguyên	lài	1	cầu	0,5	-
2	GAB2		tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	mô	2,5	cầu	1	+
3	GAB3		tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	lài	2,5	cầu	1	+
4	GAB4		tròn	trắng sữa	trơn	nguyên	lài	0,5	cầu	0,5	+
5	GAB5		tròn	trắng trong	trơn	nguyên	mô	3	que	1x0,5	-
6	GBN1	Vỏ chuối xiêm	tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	lài	3	cầu	0,5	+
7	GBN2		không đều	trắng sữa	trơn	chia thùy	mô	3	cầu	0,5	+
8	GBN3		tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	mô	2	cầu	0,5	+
9	GBN4		tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	lài	2,5	cầu	1	+
10	GBN5		tròn	vàng trong	trơn	nguyên	lài	3	cầu	1	+
11	GBN6		tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	mô	1,5	cầu	0,5	+
12	GBN7		tròn	trắng sữa	trơn	nguyên	mô	1,5	cầu	1	+
13	GBN8		tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	lài	3	cầu	1	-
14	GPA1	Vỏ khóm	tròn	trắng trong	trơn	nguyên	lài	1	cầu	0,5	+
15	GPA2		tròn	trắng đục	nhẵn	nguyên	lài	2,5	que	1,5x0,5	+
16	GPA4		tròn	trắng sữa	trơn	nguyên	mô	3	cầu	1	+
17	GPA5		tròn	trắng trong	trơn	nguyên	lài	1	cầu	1	+
18	GPA6		tròn	trắng trong	trơn	nguyên	lài	0,5	cầu	1	+
19	GPA7		tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	lài	0,5	cầu	1	+
20	GPA8		tròn	trắng trong	trơn	nguyên	mô	0,5	cầu	0,5	+
21	GSF1		Vỏ khế ngọt	tròn	trắng ngà	trơn	nguyên	lài	2,5	cầu	1
22	GSF2	không đều		trắng trong	trơn	chia thùy	mô	2	cầu	0,5	+
23	GSF3	tròn		trắng sữa	trơn	nguyên	lài	1,5	que	4x0,5	+
24	GSF5	tròn		trắng ngà	trơn	nguyên	lài	1,5	cầu	0,5	+
25	GSF6	không đều		trắng ngà	trơn	chia thùy	mô	3,5	cầu	0,5	+

**3.2. Khả năng lên men glucose tạo acid hữu cơ của các dòng vi khuẩn phân lập**

Các dòng vi khuẩn được kiểm tra khả năng tổng hợp acid hữu cơ trong môi trường PRGB. Kết quả khảo sát cho thấy trong 25 dòng vi khuẩn phân lập, 14 dòng vi khuẩn có khả năng sử dụng glucose để tổng hợp acid làm đổi màu môi trường PRGB từ đỏ sang vàng trong 5 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, thời gian tạo acid của các dòng vi khuẩn không giống nhau (Bảng 2).

Trong 14 dòng vi khuẩn khảo sát, 6 dòng GAB3, GAB5, GBN3, GBN6, GSF1 và GSF5 có khả năng tổng hợp acid làm đổi màu môi trường sau 1 ngày

nuôi cấy. Theo Cowan and Steel (1965), các dòng vi khuẩn có khả năng lên men glucose tạo acid làm giảm pH môi trường được định tính nhờ thuốc thử phenol red, khi đó môi trường chuyển từ đỏ sang vàng. Theo Gaden et al. (1992), glucose có thể được vi khuẩn chuyển hóa thành các acid hữu cơ khác nhau như acid lactic, acid citric, acid gluconic, v.v. Như vậy, những thí nghiệm ban đầu cho thấy 6 dòng vi khuẩn GAB3, GAB5, GBN3, GBN6, GSF1 và GSF5 có khả năng chuyển hóa nhanh glucose tạo thành acid nên được tuyển chọn để tiếp tục khảo sát khả năng tổng hợp acid gluconic.

**Bảng 2. Khả năng lên men tạo acid của một số dòng vi khuẩn phân lập**

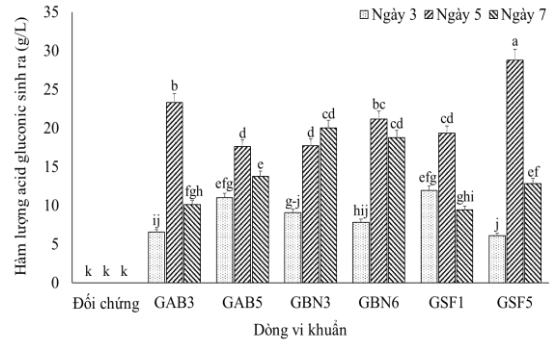
TT	Dòng vi khuẩn	Thời gian lên men (ngày)		
		1	3	5
1	GAB2	-	-	+
2	GAB3	+	+	+
3	GAB5	+	+	+
4	GBN3	+	+	+
5	GBN6	+	+	+
6	GBN7	-	+	+
7	GBN8	-	-	+
8	GPA1	-	-	+
9	GPA2	-	+	+
10	GPA4	-	-	+
11	GPA7	-	+	+
12	GSF1	+	+	+
13	GSF5	+	+	+
14	GSF6	-	+	+

Ghi chú: - : môi trường không đổi màu so với đối chứng (màu đỏ), + : môi trường đổi màu từ đỏ sang vàng.

**3.3. Khả năng chuyển hóa glucose thành acid gluconic của vi khuẩn**

Khi được nuôi cấy trong môi trường MM có bổ sung glucose (100 g/L), các dòng vi khuẩn tổng hợp acid gluconic với hàm lượng khác nhau theo thời gian, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn (Hình 2). Sau 3 ngày nuôi cấy, cả 6 dòng vi khuẩn GAB3, GAB5, GBN3, GBN6, GSF1 và GSF5 đều sinh ra acid gluconic, trong đó, dòng GSF1 tổng hợp acid gluconic cao nhất, đạt 11,93 g/L. Sau 5 ngày, dòng GSF5 có hàm lượng acid gluconic sinh ra cao nhất, đạt 28,78 g/L, khác biệt so với các dòng vi khuẩn còn lại. Ở thời điểm 7 ngày, dòng vi khuẩn GBN3 tạo acid gluconic cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng vi khuẩn còn lại, đạt 20,01 g/L.

Như vậy, qua 7 ngày nuôi cấy, hàm lượng acid gluconic sinh ra của từng dòng vi khuẩn không giống nhau. Năm dòng GAB3, GAB5, GBN6, GSF1 và GSF5 tạo ra acid gluconic vào ngày thứ 3, đạt tối đa vào ngày thứ 5 và giảm vào ngày thứ 7. Trong khi đó, dòng vi khuẩn GBN3 có hàm lượng acid gluconic sinh ra và tăng dần sau 3, 5 và 7 ngày nuôi cấy. Trong 6 dòng vi khuẩn khảo sát, dòng GSF5 có hàm lượng acid gluconic sinh ra cao nhất sau 5 ngày nuôi cấy, đạt 28,78 g/L (Hình 2).



**Hình 2. Khả năng chuyển hóa glucose thành acid gluconic của 6 dòng vi khuẩn**

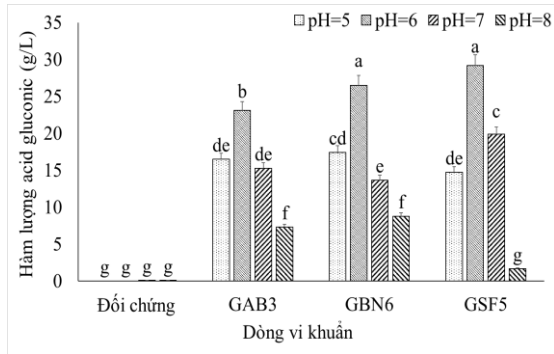
Ghi chú: Các số liệu đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Theo kết quả nghiên cứu của Sainz et al. (2016), các loài vi khuẩn thuộc chi *Gluconobacter* và *Acetobacter* được phân lập từ nho có khả năng tổng hợp acid gluconic từ glucose sau 5 ngày nuôi cấy, đạt trên 90%, với nồng độ glucose ban đầu là 250 mM (tương đương 34,56 g/L). Trong nghiên cứu này, dòng vi khuẩn GSF5 có khả năng tổng hợp 28,78 g/L acid gluconic từ 100 g/L glucose, đạt 28,78% sau 5 ngày nuôi cấy. Kết quả này phù hợp với nhận định của Sainz et al. (2016), mỗi dòng vi khuẩn có khả năng hấp thu glucose và khả năng tổng hợp acid gluconic không giống nhau. Hơn nữa, acid gluconic sau khi được tổng hợp có thể bị oxy hóa tạo thành các muối gluconate. Điều này phù hợp với kết quả khảo sát ở năm dòng vi khuẩn GAB3, GAB5, GBN6, GSF1 và GSF5 khi lượng acid gluconic sinh ra tăng từ ngày 3 đến ngày 5 và giảm ở ngày 7.

**3.4. Ảnh hưởng của pH đến sự chuyển hóa glucose thành acid gluconic ở vi khuẩn**

Ba dòng vi khuẩn GAB3, GBN6 và GSF5 có khả năng tạo ra acid gluconic cao nhất trong các dòng vi khuẩn phân lập nên được tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự chuyển hóa glucose thành acid gluconic. Kết quả khảo sát cho thấy pH môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng chuyển hóa glucose (100 g/L) thành acid gluconic (Hình 3). Khi được nuôi cấy trong môi trường có pH từ 5 đến 8, cả ba dòng vi khuẩn GAB3, GBN6 và GSF5 đều tổng hợp acid gluconic, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn. Trong đó, ở pH = 6, cả 3 dòng vi khuẩn GAB3, GBN6 và GSF5 tổng hợp acid gluconic cao nhất, đạt lần lượt là 23,11, 26,49 và 29,19 g/L, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các điều kiện pH còn lại. Ở pH = 5 và pH = 7, cả ba dòng vi khuẩn đều

tạo ra acid gluconic với hàm lượng từ 13,65 đến 19,86 g/L. Ở pH = 8, cả 3 dòng vi khuẩn tạo ra acid gluconic thấp nhất. Như vậy, môi trường có pH = 6 là điều kiện thích hợp cho sự tổng hợp acid gluconic của ba dòng vi khuẩn sau 5 ngày nuôi cấy (Hình 3).



**Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến sự chuyển hóa glucose thành acid gluconic của vi khuẩn sau 5 ngày nuôi cấy**

Ghi chú: Các số liệu đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của García et al. (2017) khi khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp acid gluconic ở vi khuẩn acid acetic. Kết quả cho thấy pH môi trường thuận lợi cho sự tổng hợp dao động từ 4,5 đến 7,0 do pH thấp hơn sẽ kích hoạt chu trình acid tricarboxylic (chu trình Krebs) và dẫn đến tổng hợp acid citric thay vì acid gluconic. Theo Yan et al. (2022), pH có ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme glucose oxidase GoxM8 tham gia vào quá trình tổng hợp acid gluconic. Môi trường có pH từ 5 đến 6 là điều kiện tối ưu cho hoạt động của enzyme GoxM8. Trong nghiên cứu này, cả ba dòng vi khuẩn GAB3, GBN6 và GSF5 đều có hàm lượng acid gluconic được tổng hợp cao nhất sau 5 ngày nuôi cấy ở môi trường có pH = 6.

### 3.5. Định danh vi khuẩn có khả năng chuyển hóa glucose thành acid gluconic

Dòng vi khuẩn GSF5 là dòng vi khuẩn tiềm năng có khả năng sử dụng glucose hiệu quả nhất trong các dòng vi khuẩn phân lập nên được giải trình tự đoạn gen 16S-rRNA. Kết quả giải trình tự và so sánh độ tương đồng cho thấy dòng vi khuẩn GSF5 có trình tự gen 16S-rRNA, với chiều dài được phân tích là 1441 nucleotide, tương đồng 100% với gen trong ứng của dòng *Staphylococcus arlettae* EE107-P1 (Accession number: MN581178.1) nên dòng vi khuẩn GSF5 thuộc chi *Staphylococcus* và được định danh là *Staphylococcus* sp. GSF5.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vai trò của vi khuẩn trong quá trình chuyển hóa các nguồn carbon khác nhau thành acid gluconic. Những dòng vi khuẩn thuộc chi *Acetobacter*, *Gluconobacter* và các loài *Zymomonas mobilis*, *Azospirillum brasiliense* và *Pseudomonas ovalis* có khả năng chuyển hóa sucrose, fructose, glucose, maltose và xylose thành acid gluconic (Ramachandran et al., 2006; Pal et al., 2016). Wang et al. (2016) sử dụng vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* đột biến để sản xuất acid gluconic, đạt 422 g/L. Vi khuẩn *Gluconobacter oxydans* có khả năng tổng hợp 230 g/L acid gluconic với năng suất 9,6 g/L/giờ ở quy mô công nghiệp sử dụng dịch thủy phân cellulose (Dai et al., 2022). Feng et al. (2023) sử dụng *Escherichia coli* tái tổ hợp để lên men mật ri đường thành acid gluconic. Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào về vi khuẩn thuộc chi *Staphylococcus* có khả năng chuyển hóa glucose thành acid gluconic được công bố. Trong nghiên cứu này, dòng vi khuẩn *Staphylococcus* sp. GSF5 là dòng vi khuẩn tiềm năng có khả năng chuyển hóa glucose (100 g/L) thành acid gluconic sau 5 ngày nuôi cấy trong môi trường MM (pH = 6) cao nhất, đạt 29,19 g/L. Đây là dòng vi khuẩn đầu tiên thuộc chi *Staphylococcus* được chứng minh có khả năng này.

Vi khuẩn thuộc chi *Staphylococcus* cũng được ứng dụng trong công nghệ thực phẩm và công nghệ sinh học. Trong công nghệ lên men phô mai, chẳng hạn trong French cheese, có 15 loài vi khuẩn *Staphylococcus* đã được ghi nhận, chủ yếu là *Staphylococcus equorum* (22%), *S. xylosus* (20%), *S. saprophyticus* (14%), *S. epidermidis* (11%) và *S. lentus* (9%). Trong công nghệ thực phẩm, vi khuẩn staphylococci có vai trò ổn định màu do có hoạt tính kháng oxy hóa, làm chậm thời gian hư hỏng, tăng hương vị do khả năng thủy phân các acid amin và acid béo. Đặc biệt, vi khuẩn *Staphylococcus* có khả năng tổng hợp các enzyme ngoại bào như lipases, nucleases, proteases và protein A. Các hợp chất này được ứng dụng phổ biến trong công nghệ sinh học như chất xúc tác và chất kháng khuẩn (bacteriocins) trong thực phẩm. Trong công nghiệp, lipases được sử dụng trong dược phẩm, bột giặt, thực phẩm, kháng oxy hóa, polymer sinh học, mỹ phẩm, v.v. (Władyska & Bonar, 2018).

## 4. KẾT LUẬN

Hai mươi lăm dòng vi khuẩn có khả năng sử dụng glucose đã được phân lập từ các mẫu vỏ trái cây, trong đó, 14 dòng vi khuẩn có khả năng lên men glucose sau 5 ngày nuôi cấy. Sáu dòng vi khuẩn gồm GAB3, GAB5, GBN3, GBN6, GSF1 và GSF5 lên

men glucose tạo acid, trong đó, ba dòng GAB3, GBN6 và GSF5 tổng hợp acid gluconic hiệu quả nhất sau 5 ngày nuôi cấy. Cả ba dòng vi khuẩn này đều tạo acid gluconic trong môi trường MM có các giá trị pH từ 5 đến 8, trong đó, pH = 6 là điều kiện tối ưu cho sự tổng hợp acid gluconic. Dòng vi khuẩn GSF5 sinh acid gluconic cao nhất, đạt 29,19 g/L và được định danh là *Staphylococcus* sp. GSF5 dựa vào

kết quả phân tích trình tự và so sánh sự tương đồng của gen 16S-rRNA. Vi khuẩn *Staphylococcus* sp. GSF5 là dòng vi khuẩn bản địa có khả năng tổng hợp acid gluconic hiệu quả do đó cần tiếp tục khảo sát các đặc điểm sinh hóa của dòng vi khuẩn này để định danh đến bậc phân loại loài làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng tổng hợp acid gluconic ở quy mô lớn hơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alonso, S., Rendueles, M., & Díaz, M. (2015). Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*. *Bioresource Technology*, 196, 314-323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.092>
- Anastassiadis, S., Aivasidis, A., & Wandrey, C. (2003). Continuous gluconic acid production by isolated yeast-like mould strains of *Aureobasidium pullulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 110-117. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1180-8>
- Ânh, K. H. (2006). *Giáo trình vi sinh vật học (phần 1)*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
- Blazej, R. G., Kumaresan, P., & Mathes, R. A. (2006). Microfabricated bio-processor for integrate nanoliter-scale Sanger DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(19), 7240-7245. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602476103>
- Buchanan, R. E., & Gibbons, N. E. (1974). Bergey's of determinative bacteriology. *America: United States of America*, 529-563.
- Cowan, S. T., & Steel, K. J. (1965). Manual for the identification of medical bacteria. *Manual for the identification of medical bacteria*.
- Dai, L., Lian, Z., Zhang, R., Nawaz, A., ul Haq, I., Zhou, X., & Xu, Y. (2022). Multi-strategy in production of high titer gluconic acid by the fermentation of concentrated cellulosic hydrolysate with *Gluconobacter oxydans*. *Industrial Crops and Products*, 189, 115748. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115748>
- Feng, T., Wang, Z., Li, H., Li, Q., Guo, Y., Zhao, J., & Liu, J. (2023). Whole-cell biotransformation for simultaneous synthesis of allitol and D-gluconic acid in recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 135(6), 433-439. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2023.03.004>
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S-rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461-2470. <https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>
- Gaden, E. L., Bonkanga, M., Harlander, S., Hesselstine, C. W., & Steinkraus, K. H. (1992). *Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods*. National Academy Press, 208.
- García-García, I., Cañete-Rodríguez, A. M., Santos-Dueñas, I. M., Jiménez-Hornero, J. E., Ehrenreich, A., Liebl, W., García-Martínez, T., & Mauricio, J. C. (2017). Biotechnologically relevant features of gluconic acid production by acetic acid bacteria. *Acetic Acid Bacteria*, 6(1), 7-12. <https://doi.org/10.4081/aab.2017.6458>
- Herrick, H. T., & May, O. E. (1928). The production of gluconic acid by the *Penicillium luteum-purpurogenum* group: II. Some optimal conditions for acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 77(1), 185-195. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84051-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84051-0)
- Lan, Y., Zuo, L., Zhou, Y., Wei, Y., & Dong, C. (2020). Development of rapid colorimetric assay for detection of gluconic acid using iron (II) and indigo carmine. *Journal of The Chemical Society of Pakistan*, 42(6), 525. <https://doi.org/10.52568/000671/JCSP/42.04.2020>
- Lu, F., Ping, K., Wen, L., Zhao, W., Wang, Z., Chu, J., & Zhuang, Y. (2015). Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of *Aspergillus niger* in submerged fermentation. *Process biochemistry*, 50(9), 1342-1348. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.010>
- Navarro, D., Mateo, E., Torija, M., & Mas, A. (2013). Acetic acid bacteria in grape must. *Acetic Acid Bacteria*, 2, 19-23. <https://doi.org/10.4081/aab.2013.s1.e4>
- Nguyen, T. P. O., Helbling, D. E., Bers, K., Fida, T. T., Wattiez, R., Kohler, H. P. E., Springael, D., & De Mot, R. (2014). Genetic and metabolic analysis of the carbofuran catabolic pathway in *Novosphingobium* sp. KN65. 2. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 8235-8252. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5858-5>
- Pal, P., Kumar, R., & Banerjee, S. (2016). Manufacture of gluconic acid: A review towards process intensification for green



- production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 104, 160-171.  
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2016.03.009>
- Peters, B., Mientus, M., Kostner, D., Junker, A., Liebl, W., & Ehrenreich, A. (2013). Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 6397-6412.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4824-y>
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., & Larroche, C. (2006). Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2).
- Sainz, F., Navarro, D., Mateo, E., Torija, M. J., & Mas, A. (2016). Comparison of D-gluconic acid production in selected strains of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 40-47.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.015>
- Stephan, M. P., Oliveira, M., Teixeira, K. R. S., Martinez-Drets, G., & Döbereiner, J. (1991). Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 77(1), 67-72.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04323.x>
- Voon, W. W. Y., Rukayadi, Y., & Meor Hussin, A. S. (2016). Isolation and identification of biocellulose-producing bacterial strains from Malaysian acidic fruits. *Letters in applied microbiology*, 62(5), 428-433.  
<https://doi.org/10.1111/lam.12568>
- Wang, D., Wang, C., Wei, D., Shi, J., Kim, C. H., Jiang, B., Han, Z., & Hao, J. (2016). Gluconic acid production by gad mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-11.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2080-x>
- Władyka, B., & Bonar, E. (2018). Application of staphylococci in the food industry and biotechnology, pp. 281-291. In: *Pet-to-man travelling staphylococci*. Vincenzo Savini (Ed.). Elsevier Inc. ISBN: 978-0-12-813547-1.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00021-2>
- Yan, Y., Liu, X., Jiang, X., Zhang, W., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Luo, H., Yao, B., & Tu, T. (2022). Surface charge modifications modulate glucose oxidase pH-activity profiles for efficient gluconic acid production. *Journal of Cleaner Production*, 372, 133817.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133817>